研究用試薬

2013 年 10 月 31 日　改定

『 TAC® Cry j2　ELISA KIT 』取扱説明書

この度は弊社製品をご購入いただきましてありがとうございます。ご使用に際してはキットに同梱された取扱説明書のみに従って測定を実施して下さい。なお、操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント(動画)]、並びに[Q&A](キットの蓋を開けた際に一番上にあるカード(13×10cm)に記載されたパスワードをご利用下さい)をご参照下さい。

1.使用目的

本キットはスギアレルゲンである日本スギ花粉(*Japanese cedar pollen*)の Cry j2 を定量的に測定するためのサンドイッチ酵素免疫測定法です。本キットは研究のみにご使用下さい。

特長

●全反応時間は 2 時間 20 分です。
●微量な試料で測定可能です。
●1 キットは 96 ウエルです。
●全ての試薬は溶液タイプです。

2.キットの保存と使用期限

キットは 2～8℃で保存して下さい(凍結厳禁)。この保存条件下でキットは製造月から 6 ヵ月(外箱のラベルに記載)までは安定です。有効期限の過ぎた試薬は使用しないで下さい。開封した各試薬につきましては、保管状態により影響を受ける可能性がありますので早めのご使用を推奨します。

3. 測定原理

本キットは標準品、希釈検体を抗 Cry j2 抗体固相化マイクロプレートウエル中でインキュベートします。1 時間のインキュベーションと洗浄後、HRP(ペルオキシダーゼ)結合抗 Cry j2 抗体を加え、1 時間インキュベートします。再度の洗浄後、ウエルに残った HRP(ペルオキシダーゼ)を発色液(TMB)と反応させます。反応は酸性の溶液の添加で停止され、反応の結果生じた黄色の産物が 450nm(副波長 620nm)で比色測定されます。吸光度は Cry j2 濃度にほぼ比例します。標準品濃度に対して吸光度をプロットし標準曲線を作製し、この標準曲線から未知検体中の濃度が決定されます。

4.注意事項

●本キットは ELISA 法の研修を終了した方、または指導者の下でご使用下さい。
用手法操作で測定する際にはピペッティング操作の再現性が安定した方がご使用下さい。
●準備並びに本キット操作中は手袋、眼鏡、保護用着衣を身につけて下さい。
●試薬類を皮膚に付けないで下さい。本キットの試薬が誤って、目、口、傷口、皮膚等に付着した場合は直ちに水道水で充分に洗い流す等の応急処置を行い、必要な場合は医師の手当てを受けて下さい。
●本キットを使用している場所では飲食や喫煙をしないで下さい。
●**標準溶液、試料はアレルゲン性があるものとして充分注意して取り扱って下さい。**
●使用済みの検体、使用した消耗品等は 1%ホルマリン、2%グルタールアルデヒドまたは 0.1%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に 1 時間以上浸けて下さい。またはオートクレーブ滅菌処理して廃棄して下さい。使用した消耗品や未使用の薬品類は所属施設の規定並びに各地域の法令に従って廃棄して下さい。
●試薬類は口でピペッティングしないで下さい。
●ロット番号の違う試薬とは混ぜて使わないで下さい。
●各ステップでの静置反応時には、ウエルの乾燥、異物の混入、温度の偏り、分注試薬の蒸発を防止する為、必ずプレートシールを貼って下さい。
●ELISA 法は測定環境により影響を受けます。測定操作、静置反応場所の室温:20～25℃(実験台上またはインキュベータ内温度)を厳守して下さい。また、風速(エアコン風も含む):0.4m/sec(*①)以上、湿度 30%未満の環境下での測定は避けて下さい(9.技術上のヒントをご参照下さい)。
(*①)風速 0.4m/sec の目安は弊社 Web サイトの動画「反応条件」をご参照下さい。

5. 構成品

構　成　品	状　態	容　量
(A) 抗体固相化 96 ウエルプレート	洗浄後使用	96 wells(8×12)／1 枚
(B) Cry j2 標準溶液(250 ng/ml)	希釈後使用	200μl／1 本
(C) 測定用緩衝液(透明)	そのまま使用	60ml／1 本
(D) HRP 結合抗 Cry j2 抗体	希釈後使用	200μl／1 本
(F) 発色液(TMB)	そのまま使用	12ml／1 本
(G) 抽出用緩衝液	そのまま使用	100ml／1 本
(H) 反応停止液(1M H_2SO_4) ※取扱注意	そのまま使用	12ml／1 本
(Ⅰ) 濃縮洗浄液(10×)	希釈後使用	100ml／1 本
プレートシール		3 枚
取扱説明書		1 部

6.添付されていないが必要な器具　□チェックリスト

□精製水(蒸留水)
□標準溶液希釈用試験管
□洗浄液希釈用ガラス器具(メスシリンダー・ビーカー・瓶)
□チップ交換型ピペット(使い捨てチップで 10～50μl を正確にピペッティングできるもの、及び 50～500μl を正確にピペッティングできるもの)
□連続分注ピペット(例 Eppendorf の multipette plus)、100μl を連続分注できるもの
□ペーパータオル等の吸水性のあるもの(洗浄後にプレートに残った液を取り除く)
□撹拌器(Vortex タイプ)
□マイクロプレート振とう器(約 600～1,200 rpm)
□96 ウエルプレート用洗浄機(あれば好ましい)または噴射ビン(弊社 Web サイトの動画「洗浄操作」をご参照下さい。)
□96 ウエルプレートリーダー(450 ±10 nm 、620nm:600～650nm)
□データ計算用ソフトウェア

7.試薬の調製

＊キットの試薬は使用前に必ず室温(20～25℃)に戻して下さい(2 時間位が目安です)。
＊6.で「そのまま使用」とある試薬は室温化後そのままの状態で使用できます。「希釈後使用」とあるものについては下記の要領で調製して下さい。
＊測定に必要な分だけ試薬を調製して下さい(ご不明な際にはお問い合わせ下さい)。

【濃縮された試薬類】

[(B)Cry j2 標準溶液(250 ng/ml)];標準曲線作製用

(B)Cry j2 標準溶液(250 ng/ml)(原液)と(C)測定用緩衝液を使って標準溶液を調製して下さい。
下記は一例です。

標準溶液の容量	測定用緩衝液	濃度(ng/ml)
原液 50μl	450μl	25
25 ng/ml 溶液 250μl	250μl	12.5
12.5 ng/ml 溶液 250μl	250μl	6.25
6.25 ng/ml 溶液 250μl	250μl	3.13
3.13 ng/ml 溶液 250μl	250μl	1.56
1.56 ng/ml 溶液 250μl	250μl	0.78
0.78 ng/ml 溶液 250μl	250μl	0.39
0(ブランク)	250μl	0

[(D)HRP 結合抗 Cry j2 抗体]

200μl を充分分取できる量をご提供しています。
濃縮液を(C)測定用緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。

［(I)濃縮洗浄液(10×)］

濃縮洗浄液（10×）を室温化された精製水（蒸留水）で 10 倍に希釈して下さい。

例：100ml の濃縮洗浄液（10×）＋900ml の精製水（蒸留水）（96 ウエル全てを使用する場合）

【試薬の安定性と保存方法】

(A)抗体固相化 96 ウエルプレート

未使用(冷蔵状態を保った状態でシールを剥がしていない)抗体固相化ストリップは同梱のジップシールパックに戻し、そのまま 2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(B)Cry j2 標準溶液(250 ng/ml)

キットを分割して使用する際は使用する直前に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。希釈した各標準溶液は直ちに使用し、保存はしないで下さい。

(C)測定用緩衝液 、(F)発色液(TMB) 及び(G)抽出用緩衝液

一部の溶液を使用する際は必要量より少し多めの量を別の容器に移し、残りは室温に戻さないで直ちに蓋をしっかり閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(D)HRP 結合抗 Cry j2 抗体

キットを分割して使用する際は希釈時に冷蔵庫より取り出し希釈調製し、残りの原液は室温に戻さないで直ちに蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み液は廃棄して下さい。

(H)反応停止液(1M H_2SO_4)

使用残りを保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。

(I)濃縮洗浄液(10×)

濃縮洗浄液(10×)を保存する場合は、蓋をしっかりと閉め、2～8℃で保存して下さい。有効期限内安定性を保ちます。使用残りの希釈済み洗浄液は廃棄して下さい。

8.技術上のヒント

●検体と試薬に不純物が混ざらないように気をつけて下さい。1 ウエル／1 チップのご使用をお薦めします。

●発色液は 96 ウエルプレートに使用するまではほぼ無色または薄い黄色澄明です。光を避けて保存して下さい。

●反応停止液は使用するまでは無色です。

●やむを得ず、測定操作を、風速：0.4m/sec 以上、湿度 30%未満の環境下で実施する場合には、各ステップの静置反応時、プレートシールをすることに加え、下記のような方法をご検討下さい。

例）インキュベータ内、発泡スチロール製箱内で静置反応させる等。測定室の環境条件により対策方法が異なる場合がありますので、詳細を弊社 Web サイトの動画「反応条件」でご確認下さい。

9.検体の調製

●収集した試料を、(G)抽出用緩衝液を用い前処理（抽出）を行って下さい。

収集した試料に対し、(G)抽出用緩衝液を 20 倍量(W/V)になるように添加し室温で 30 分間撹拌し抽出します。その後、フィルターろ過(0.45μm)、又は遠心分離等で不溶解物を除去し抽出検体とします。抽出検体は(C)測定用緩衝液を用いて標準曲線範囲内に入るように希釈調製し、100μl／ウエル用いて下さい。

*試料の収集には、収集用フィルター等の市販品をご使用下さい。

（本キット構成には、試料収集用フィルター等は含まれておりません。）

希釈検体調製例	10 倍	50 倍	100 倍	200 倍・・・
抽出検体 :	**50**μl	*100μl	*250μl	* 250μl
測定用緩衝液(C) :	450μl	400μl	250μl	250μl

註）＊ひとつ低倍率の希釈検体

【検体の取扱い】

●検体の抽出には、添付の（G）抽出用緩衝液の使用を推奨します。

●検体の希釈は（C）測定用緩衝液を用いて用時調製して下さい。

●濁り及び不溶解物のある検体は除去後、測定に使用して下さい。

●添付の（G）抽出用緩衝液や記載の抽出方法は、全ての試料に対し完全な抽出を保障するものではありません。

●添付の(G)抽出用緩衝液以外で調製した検体は、妨害物質の影響を確認して下さい。

【検体の保存】

●抽出した検体は出来るだけ速やかに測定に用いて下さい。また、長期保存する場合は-35℃以下で凍結保存して下さい。但し、繰り返しの凍結融解は避けて下さい。

【妨害物質の影響】

●疑わしい検体は、異なる 2 ポイント以上の希釈率で希釈直線性を確認して下さい。

10.測定操作法

洗浄操作を始める前に次に分注する試薬を前もって用意して下さい。

抗体固相化プレートのシールは、プレートが充分に室温に戻ってから剥がして下さい。

(1) プレート保護液を捨て、あらかじめ調製した洗浄液を各ウエルに満たし、3 回洗浄(*②)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。

(2) 検体測定ウエルに測定用緩衝液で希釈した検体を 100μl ずつ分注します。

(3) 標準品測定ウエルに各濃度の標準溶液を 100μl ずつ分注します。

(4) マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*③)します。

(5) プレートシールを貼り、室温(20～25℃)で 1 時間静置(*④)します。

(6) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし、3 回洗浄(*②)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。

(7) 各ウエルに HRP 結合抗 Cry j2 抗体を 100μl ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*③)します。

(8) プレートシールを貼り、室温(20～25℃)で 1 時間静置(*④)します。

(9) 反応終了後、反応液を捨て洗浄液を各ウエルに満たし 3 回洗浄(*②)します。その後、ペーパータオルなどの上でプレートを逆さにし、軽く叩きつけるようにしてウエルに残った液を取り除きます。

(10) 各ウエルに発色液を 100μl ずつ分注します。マイクロプレート振とう器などを用いて撹拌(*③)します。

(11) プレートシールを貼り、室温(20～25℃)で 20 分間静置(*④)します。

(12) 各ウエルに反応停止液を 100μl ずつ分注し、発色反応を停止します。

(13) 撹拌(*③)後マイクロプレート用分光光度計で 450nm(副波長 620nm)での吸光度を測定します。副波長は 600～650nm の範囲で使用できます。

(*②)、(*③)、(*④) 測定手順概要(7 ページ)をご参照下さい。

ワークシート(例)

	Strip 1&2	Strip 3&4	Strip 5&6	Strip 7&8	Strip 9&10	Strip 11&12
A	25 ng/ml	検体 1	検体 9	検体 17	検体 25	検体 33
B	12.5 ng/ml	検体 2	検体 10	検体 18	検体 26	検体 34
C	6.25 ng/ml	検体 3	検体 11	検体 19	検体 27	検体 35
D	3.13 ng/ml	検体 4	検体 12	検体 20	検体 28	検体 36
E	1.56 ng/ml	検体 5	検体 13	検体 21	検体 29	検体 37
F	0.78 ng/ml	検体 6	検体 14	検体 22	検体 30	検体 38
G	0.39 ng/ml	検体 7	検体 15	検体 23	検体 31	検体 39
H	0	検体 8	検体 16	検体 24	検体 32	検体 40

11.計算

(1)測定毎に標準曲線を作製します。両対数を使用しX軸を標準溶液濃度(ng/ml)、Y軸を吸光度の標準曲線グラフを作製して下さい。標準曲線は弊社 Web サイト「技術情報」「ELISA の標準曲線」をご参照下さい。

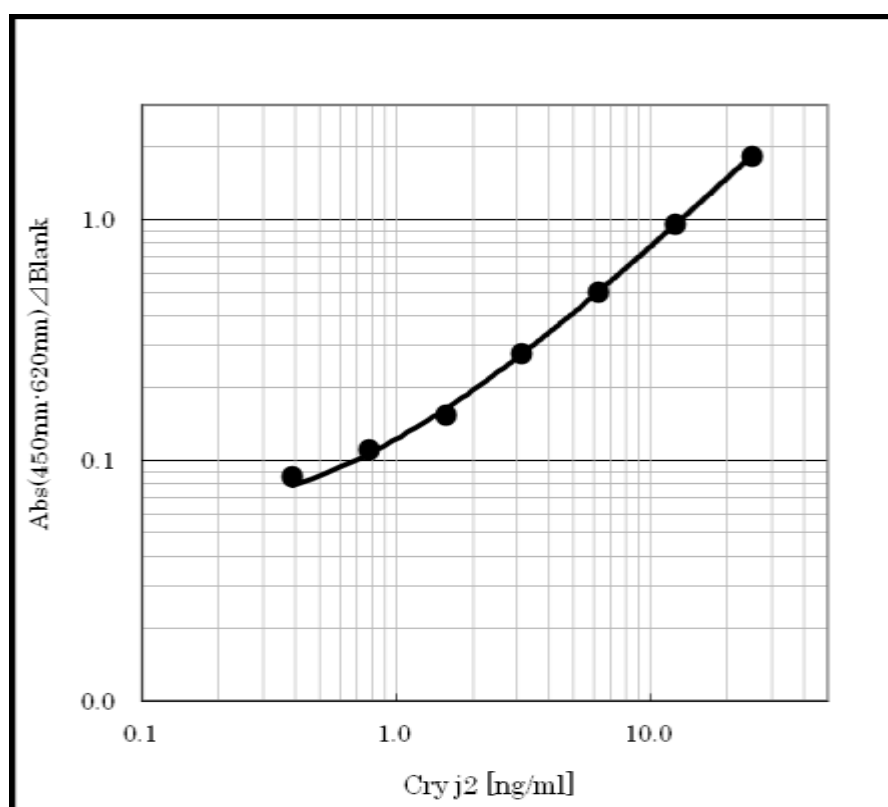
(2)標準曲線より、検体の吸光度に対応する濃度(ng/ml)を読み取ります。**読み取った濃度に検体希釈率を乗じ測定値とします。**

＊検体の吸光度が標準曲線吸光度より外れた場合は(C)測定用緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定を実施して下さい。

＊一番高濃度の標準溶液の吸光度付近の検体は(C)測定用緩衝液にて適当倍率に調製し再度測定することをお薦め致します。

(3)反応温度が高い場合、吸光度が全体的に高くなります。測定機器によりますが吸光度の信頼性のない領域の標準曲線は使用しないで下さい。また、反応温度を 20～25℃範囲内にして再測定を実施して下さい。

＊コンピュータソフトでの演算処理では、3 次多項式または 4 パラメーターの使用をお薦め致します。

＊プレートリーダーは SUNRISE RAIBOW(TECAN)を使用。グラフは標準曲線例です
（吸光度は、測定環境により変動します）。

12.キットの性能

●測定範囲

0.39～25 ng/ml の範囲で測定できます。

●特異性

HRP 結合抗体はスギ花粉の Cry j2 抗原を特異的に認識します。Cry j1 抗原との交差反応性は 0.1%以下です。

●精度試験（アッセイ内変動）（5 重測定、2 検体）　　平均 C.V.値は 5%未満

●再現性試験（アッセイ間変動）（3 重測定、3 検体、4 日間）　　平均 C.V.値は 5%未満

●添加回収試験

2 検体に異なる 3 濃度の Cry j2 を添加し測定した結果、回収率は 96.0%から 102%でした。

●希釈直線性

2 検体を連続的に測定用緩衝液で 3 段階希釈し測定した結果、直線回帰の R^2 は 0.9984 と 0.9998 でした。

13.トラブルシューティングと Q&A

●すべてのウエルでの反応が弱い

可能な解釈

1)標準品や検体の入れ忘れ。
2)発色に関連する試薬溶液の入れ忘れ。
3)発色に関連する試薬溶液の取り違えや希釈調製不良。
4)酵素阻害剤の混入。
5)キット保管温度の影響(凍結した場合)。
6)プレートの過剰な洗浄。
7)発色液の温度が低かった。

●最小標準溶液濃度(0.39 ng/ml)の OD 値よりブランク OD 値が高くなる。

可能な解釈・・・ 洗浄が不適当、不完全であった。

(ペルオキシダーゼ標識物と反応後の洗浄回数 3 回を同じ流速で 4〜6 回に増やして下さい。)

●変動係数(CV)が大きい

可能な解釈

1)洗浄が不適当、不完全であった。
2)標準品や管理血清、または検体の撹拌が不充分であった(凍結検体の撹拌は充分に行って下さい)。
3)ピペッティング操作が一定ではなかった。

●Q-1 :キットは分割して使用することができますか?

A-1 :できます。プレートに貼られた透明シールをストリップの間にそってカッターなどで切り離してご使用下さい。使用しないプレートはシールを貼った状態で冷蔵庫に保管して下さい。

●Q-2 :プレートを取り出したらウエルの中に液体が入っていましたが何ですか?

A-2 :出荷時に保存安定液を充填してあります。

●更に詳しいトラブルシューティングや Q&A は弊社ホームページをご覧下さい。

【測定手順概要とチェックリスト】

必ず取扱説明書を一読して検体条件、測定条件、測定方法を確認後測定操作を行って下さい。

操作法は弊社 Web サイト[良い結果を出すためのポイント(動画)] 並びに「Q&A」をご参照下さい。

□ ウエルプレート、試薬類を充分に室温(20～25℃)に戻して下さい。室温化には 2 時間位必要

□ 濃縮洗浄液の希釈 ：室温化された精製水で、10 倍に希釈して下さい。

□ 標準溶液の希釈(例)：室温化された(C)測定用緩衝液で、希釈して下さい。

希釈例	濃度(ng/ml)	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	0
	標準溶液(μl)	**原液：50**	250*	250*	250*	250*	250*	250*	0
	測定用緩衝液(μl)	450	250	250	250	250	250	250	250

＊：ひとつ高濃度の標準溶液

	操作		各操作注意事項並びに関連情報
□	**抗体固相化 96 ウエルプレート**		
□	↓洗浄 3 回 (＊②)		洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
□	**希釈検体または Cry j2 標準溶液**	100μl	「ピペッティング」の動画参照
□	↓撹拌(＊③)、室温(20～25℃)、1 時間反応、静置(＊④) ⇨		第一反応「反応条件」の動画参照
□	HRP 結合抗 Cry j2 抗体の希釈 室温化された(C)測定用緩衝液で 100 倍に希釈して下さい。		希釈溶液の調製は第一反応中に行う
□	↓洗浄 3 回 (＊②)		洗浄液除去後、直ちに次の試薬分注
□	**HRP 結合抗 Cry j2 抗体**	100μl	「ピペッティング」の動画参照
□	↓撹拌(＊③)、室温(20～25℃)、1 時間反応、静置(＊④) ⇨		第二反応「反応条件」の動画参照
□	↓洗浄 3 回(＊②)		洗浄液除去後、直ちに発色液分注
□	**発色液(TMB)** TMB が室温化されていることを確認	100μl	分注後、濃度により青色に変色
□	↓撹拌(＊③)、室温(20～25℃)、20 分間反応、静置(＊④) ⇨		第三反応「反応条件」の動画参照
□	**反応停止液(1M H_2SO_4)** 強酸性につき取扱注意	100μl	分注後、濃度により黄褐色に変色
□	↓撹拌(＊③)		直ちに撹拌
□	**吸光度測定(主波長 450nm、副波長 620nm:600～650nm)**		副波長はプレート裏面の汚れ等をキャンセルします

(＊②) **洗浄液をウエルに分注後、手のひらの上で 10 秒ほど軽く振り廃棄します。**3 回連続洗浄後、ペーパータオル上にプレートを逆さにして叩き洗浄液を完全に除去します。洗浄液除去後の乾燥に注意して次の溶液を直ちに分注します。洗浄液をピペットで添加する際の液量目安は 300μl／ウエルです。万一、最小標準溶液濃度（0.39 ng/ml）の OD 値よりブランク OD 値が高くなる場合は解決方法の 1 つとして、ペルオキシダーゼ結合物と反応後の洗浄回数 3 回を同じ流速で 4～6 回に増やして下さい。プレート洗浄機ご使用の場合の圧力目安は 5～25ml／分（ノズルの径により異なります）です。第一反応後の初回の洗浄のみウエル間のコンタミに注意して下さい。「洗浄操作」の動画をご参照下さい。

(＊③) 撹拌の目安は 600～1,200rpm-10 秒間、3 回。「撹拌操作」の動画をご参照下さい。

(＊④) 撹拌終了後プレートシールを貼って静置して下さい。「反応条件」の動画をご参照下さい。
プレートシールは保護紙を剥がして、粘着面をプレート側にして貼り付けて下さい。一度使用したプレートシールは再使用しないで下さい。

ワークシート

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

【測定名】＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

【所属】＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

【測定者】＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿ 【測定日】＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

【キットロット番号】＿＿＿＿＿＿＿＿ 【有効期限】＿＿＿＿＿＿＿＿

【備考】＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

【製品名】 ；TAC® Cry j2 ELISA KIT

【コード番号】 ；AKCJ2-010

【英語表記】 ；TAC® Cry j2 ELISA KIT(AKCJ2-010,Shibayagi Co.,Ltd, Gunma,Japan)

【お問い合せ先】

製造／発売元；株式会社　シバヤギ

〒377-0007　群馬県渋川市石原 1062-1

TEL.0279-25-0279　　FAX.0279-23-0313

<E-mail>syc-info@shibayagi.co.jp　　<URL>http://www.shibayagi.co.jp